

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

2 820 058

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

01 01159

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : B 01 L 3/00, G 01 N 35/00, 1/44

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 29.01.01.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 02.08.02 Bulletin 02/31.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-  
MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-  
que et industriel — FR.

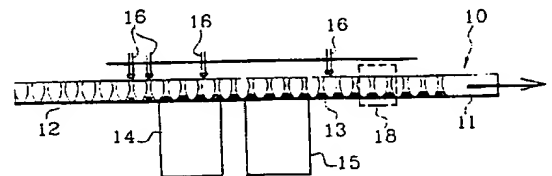
⑦2 Inventeur(s) : FOUILLET YVES, CHARLES  
RAYMOND, SARRUT NICOLAS et CLAUSTRE PATRI-  
CIA.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : BREVATOME.

⑤4 PROCÉDE ET SYSTÈME PERMETTANT DE RÉALISER EN FLUX CONTINU UN PROTOCOLE BIOLOGIQUE,  
CHIMIQUE OU BIOCHIMIQUE.

⑤7 L'invention concerne la réalisation, en flux continu,  
d'un protocole biologique, chimique ou biochimique sur des  
substances à analyser, le protocole comportant la mise en  
œuvre de plusieurs étapes. Il est procédé à :  
- la mise en défilement d'un support d'analyse mobile  
(10) comprenant des moyens de réception (12) des sub-  
stances à analyser et de réactifs,  
- la mise en œuvre des étapes du protocole sur les  
substances à analyser pendant le défilement du support  
d'analyse mobile (10).



FR 2 820 058 - A1



**PROCEDE ET SYSTEME PERMETTANT DE REALISER EN FLUX  
CONTINU UN PROTOCOLE BIOLOGIQUE, CHIMIQUE OU  
BIOCHIMIQUE**

5

**DESCRIPTION**

**DOMAINE TECHNIQUE**

L'invention concerne un procédé et un système permettant de réaliser en flux continu un protocole biologique, chimique ou biochimique. Elle  
10 permet de réaliser un protocole complet d'analyse sur un grand nombre d'échantillons.

**ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE**

Pour des études biologiques, il est nécessaire de réaliser des réactions chimiques,  
15 biochimiques ou biologiques suivant un protocole bien déterminé. Ces réactions font très souvent intervenir des étapes de mélanges, des étapes de traitement thermique, des étapes d'incubation, des étapes de détections.

20 Par exemple, le système peut être utilisé pour la synthèse de produits chimiques fins, c'est-à-dire ceux fabriqués en petits volumes et/ou avec une très haute qualité, où des séries d'étapes impliquant un traitement de réactifs et/ou l'injection de réactifs  
25 sont requises. Le système peut aussi être utilisé pour le dépistage de drogues, par exemple lorsqu'une drogue est liée à une protéine cible, ou pour les analyses biologiques comme la détection d'une interaction protéine-protéine ou la détection d'un composant  
30 protéiné dans un échantillon biologique complexe.

A titre d'exemple de réaction chimique ou biologique, dans le domaine de la génétique, on utilise très largement le procédé de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (de l'anglais "Polymerisation Chain Reaction"). Une étape de PCR nécessite le mélange d'un échantillon d'ADN avec des réactifs nécessaires à l'amplification. Il faut ensuite faire cycliser en température les volumes de réactions entre des températures pouvant être comprises entre 50°C et 94°C.

Pour rentabiliser les installations des laboratoires, il est nécessaire de concevoir des machines optimisant les points suivants :

- minimiser les volumes d'échantillons et de réactifs pour minimiser le coût de mise en œuvre des réactions,

- mettre en série plusieurs réactions dans un même système, l'idéal étant de réaliser tout un protocole biologique sur une même machine,

- mettre en parallèle un grand nombre d'analyses, ce qui permet d'accroître la capacité des laboratoires (en nombre d'analyses réalisées par jour et par machine).

Il existe actuellement deux grandes familles de machines permettant de réaliser un protocole complet d'analyse chimique ou biologique d'un grand nombre d'échantillons. Une première famille est constituée par les systèmes où les liquides sont déposés dans des puits. Une deuxième famille est constituée par des micro-systèmes où les fluides sont véhiculés dans des microcanaux. On utilise aussi les

termes  $\mu$ TAS pour "Total Analysis System" ou  $\mu$ FIA pour "Flow Injection Analysis".

Concernant la première famille de machine, l'échantillon biologique est placé dans un réservoir  
5 réalisé dans une plaque et ayant la forme d'un puits qui est porté successivement aux températures désirées pour effectuer les traitements thermiques nécessaires aux réactions biologiques. Les appareils commerciaux tels que ceux produits par la société M.J. Research ou  
10 par la société Perkin Elmer utilisent généralement un système de thermostatisation par effet Peltier. Cette méthode est simple à mettre en œuvre et les composants sont standardisés dans le cas de plaques de titration comportant 384 puits répartis selon une matrice de 16  
15 lignes et 24 colonnes.

Chaque opération du protocole biologique (remplissage, PCR, ajout d'un réactif...) se fait en général sur des machines différentes. Suivant le nombre d'analyses à réaliser, la gestion des échantillons, des  
20 réactifs et des plaques peut devenir très compliquée. Ce genre de machine ne permet pas de travailler en flux continu de réactions, les machines ne permettant généralement de ne traiter qu'une seule plaque à la fois.

25 Concernant la deuxième famille de machines, qui est plus récente que la première famille, des microcanaux permettent de véhiculer les liquides nécessaires aux réactions. Les avantages de cette deuxième famille sont nombreux. On peut citer :

30 - la miniaturisation des volumes des réactifs et des échantillons,

- l'intégration de plusieurs réactions sur le même composant, ce qui permet à l'ensemble d'un protocole biologique d'être effectué sur une même biopuce et ce qui minimise ou facilite l'automatisation des opérations de manipulation,

- la réalisation de protocoles en parallèle sur plusieurs canaux.

Les canaux peuvent être obtenus par gravure dans des substrats en silicium, en verre ou un matériau polymère. Les liquides en réaction circulent en traversant des zones à température contrôlée. On peut se référer à ce sujet à l'article "Continuous Flow PCR on a Chip" de M.U. KOPP et al., Proceedings of the  $\mu$ TAS'98 Workshop, Banff, Canada, 13-16 octobre 1998, Ed. Kluwer Academic Publishers, pages 7 à 10.

Il existe aussi des systèmes où plusieurs échantillons circulent en même temps sur les mêmes canaux. On parle alors de flux continu de réactions. On peut se référer à ce sujet à l'article "Synthesis and Analysis of Chemical Components in Nanoscale" de E. LITBORN et al., Proceedings of the  $\mu$ TAS'2000 symposium, pages 447 à 454, et à la demande internationale WO-A-00/21 666.

Malheureusement, la mise au point de ces composants reste difficile, principalement en raison du problème du contrôle du transport des liquides dans les canaux. La mise en mouvement des liquides nécessite des méthodes de pompage intégré comme l'électro-osmose ou des systèmes de distribution par pression ou par débits imposés qui restent difficiles à mettre au point et sont souvent d'un prix de fabrication très élevé. La

fonction de pompage, pour véhiculer les liquides dans des canaux où sont effectuées les réactions du protocole, est cependant un point clef et incontournable de tous les composants dits "lab on a chip".

Le brevet américain N° 5 736 106 divulgue un dispositif permettant de réaliser un protocole de traitement thermique sur une substance. Le dispositif comprend une plaque conductrice de la chaleur possédant des cavités servant de chambres de réaction et contenant une substance à analyser. Les chambres de réaction sont obturées par une feuille transparente. Un mécanisme de tapis roulants permet d'amener la plaque à des positions fixes successives pour porter le contenu des cavités à des températures déterminées.

#### EXPOSÉ DE L'INVENTION

L'invention permet de cumuler les avantages présentés par les techniques de l'état de l'art tout en minimisant les inconvénients. Elle permet de travailler en flux continu d'analyse sur une même machine afin d'augmenter la rentabilité des laboratoires. Elle permet de réaliser toutes les étapes d'un protocole biologique sur une même machine en intégrant l'injection de réactifs ou d'échantillons, le mélange de réactifs, la détection d'analytes, des traitements optiques ou thermiques ou en mettant en œuvre des fonctions telles que le cyclage en température, les mélanges de réactifs et éventuellement la détection. Elle ne nécessite pas la mise au point de systèmes complexes de pompage de liquide dans des microcanaux.

L'invention met en œuvre un support d'analyse qui se déplace de manière continue ou à un petit pas. Contrairement au brevet américain N° 5 736 106, cité plus haut, les étapes du protocole  
5 peuvent se faire simultanément sur un grand nombre d'échantillons, ce qui permet de réaliser en continu les protocoles biologiques.

Un premier objet de l'invention consiste en un système permettant de réaliser en flux continu un  
10 protocole biologique, chimique ou biochimique sur des substances à analyser, le protocole comportant la mise en œuvre de plusieurs étapes, le système étant caractérisé en ce qu'il comprend :

- un support d'analyse mobile comprenant  
15 des moyens de réception des substances à analyser et de réactifs,

- des moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole, disposés de façon que les moyens de réception du support défilent devant eux lors  
20 de la mise en œuvre de ces étapes.

Il peut comprendre en outre des moyens permettant d'apporter successivement les substances à analyser et les réactifs jusqu'aux moyens de réception du support d'analyse mobile. Il peut aussi comprendre  
25 en outre des moyens de détection appliqués aux substances ayant subi les étapes du protocole pour fournir une analyse de ces substances.

Avantageusement, les moyens de réception sont disposés de façon à constituer une matrice de  
30 lignes et de colonnes.

De préférence, le support d'analyse mobile est pourvu de moyens permettant d'éviter l'évaporation des substances à analyser et des réactifs. Ces moyens permettant d'éviter l'évaporation peuvent être choisis

5 parmi :

- une atmosphère à humidité contrôlée,
- un milieu liquide non miscible avec les substances à analyser, les réactifs et les produits de réaction entre substances à analyser et réactifs,
- 10 - un film de liquide non miscible avec les substances à analyser et les réactifs, recouvrant les moyens de réception et apte à être traversé par les substances à analyser et les réactifs.

Les moyens permettant la mise en œuvre des  
15 étapes du protocole peuvent comprendre des moyens d'apport d'énergie. Les moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole peuvent aussi comprendre des moyens pour injecter un réactif ou un échantillon, des moyens de traitement optique (par exemple un  
20 traitement ultra-violet) d'un réactif ou d'un échantillon, des moyens d'application d'un champ magnétique, des moyens d'aspiration pour enlever tout ou partie d'un volume de réaction, des moyens de détection, par exemple pour détecter un paramètre d'un  
25 constituant d'un échantillon ou de tout marqueur détectable, et des moyens de traitement thermique d'un échantillon. Ces moyens d'apport d'énergie peuvent être des moyens de chauffage permettant de porter les moyens de réception à une température déterminée. Ces moyens  
30 de chauffage peuvent comprendre au moins un barreau thermique porté à ladite température déterminée. Le



barreau thermique peut être porté à ladite température déterminée par la circulation d'un fluide caloporteur et/ou par effet Joule et/ou par effet Peltier et/ou par un rayonnement lumineux. Le système peut comprendre en  
5 outre des moyens pour rapprocher le support d'analyse mobile du barreau thermique.

Selon un exemple de réalisation, les moyens permettant d'apporter les substances à analyser et les réactifs, et les moyens permettant la mise en œuvre des  
10 étapes du protocole sont agencés de façon à obtenir successivement :

- l'apport d'un premier composé chimique dans un volume de réaction jusqu'au moyen de réception,
- le déplacement du support d'analyse  
15 mobile vers un premier élément d'injection,
- l'apport d'un deuxième composé chimique dans le volume de réaction par le premier élément d'injection,
- et optionnellement, le déplacement du  
20 support d'analyse mobile vers un deuxième élément d'injection pour apporter un troisième composé chimique au volume de réaction.

Les moyens de détection peuvent être des moyens fournissant une analyse des substances  
25 directement sur le support d'analyse mobile ou des moyens fournissant une analyse des substances après leur transfert du support d'analyse mobile.

Selon une première variante de réalisation, le support d'analyse mobile est constitué par une  
30 plaque, les moyens de réception étant constitués par des puits réalisés dans la plaque. Dans ce cas, les

moyens permettant d'apporter les substances à analyser et les réactifs comprenant des capillaires s'introduisant dans les puits, les puits peuvent présenter un col favorisant le décrochage des substances à analyser et des réactifs desdits capillaires. La plaque peut être en un matériau choisi parmi le silicium, le verre et le plastique (par le terme plastique, on désigne également les polymères). Les moyens de réception peuvent être constitués de trous traversant la plaque, le fond des trous étant obturé par un film adhérent à une face de la plaque. Ils peuvent aussi être constitués par des cuvettes réalisées à partir d'une face de la plaque.

Selon une deuxième variante de réalisation, le support d'analyse mobile est constitué par une plaque, les moyens de réception étant constitués par des plots disposés sur une face de la plaque et permettant l'accrochage des substances à analyser.

Selon une troisième variante de réalisation, le support d'analyse mobile est un film. Les moyens de réception peuvent résulter de forces de capillarité entre une surface du film et les substances à analyser. Le film peut être mobile entre un rouleau dérouleur et un rouleau enrouleur. Si le film est un film uniforme, la surface du film peut être une surface hydrophile. Le film peut être un film structuré, la structuration du film permettant de déterminer l'emplacement des moyens de réception. Par exemple, la surface du film peut être hydrophobe et supporter et des plots hydrophiles constituant lesdits moyens de réception. Par exemple encore, la surface du film peut

présenter des cuvettes constituant lesdits moyens de réception. Le film peut posséder une conductivité thermique anisotrope, la conductivité thermique selon l'épaisseur du film étant supérieure à la conductivité thermique dans le plan du film.

Selon une quatrième variante de réalisation, le support d'analyse mobile comprend au moins un fil permettant l'accrochage de gouttes des substances à analyser, les moyens de réception résultant de forces de capillarité entre le fil et les substances à analyser. Le fil peut être mobile entre un rouleau dérouleur et un rouleau enrouleur. Il peut être hydrophile. Selon un exemple particulier, les moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole comprenant des moyens de chauffage des gouttes accrochées sur le fil, ces moyens de chauffage comprennent un milieu liquide porté à une température déterminée, non miscible avec les substances à analyser et avec les produits de réaction entre substances à analyser et réactifs, les gouttes passant à travers ce milieu liquide lors du défilement du support. Selon un autre exemple particulier, les moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole comprenant des moyens de chauffage des gouttes accrochées sur le fil, ces moyens de chauffage comprennent un élément pourvu d'un trou de passage dudit fil et porté à une température déterminée.

Un deuxième objet de l'invention consiste en un procédé de réalisation, en flux continu, d'un protocole biologique, chimique ou biochimique sur des substances à analyser, le protocole comportant la mise

en œuvre de plusieurs étapes, le procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en défilement d'un support d'analyse mobile comprenant des moyens de réception des substances à analyser et de réactifs,

- la mise en œuvre des étapes du protocole sur les substances à analyser pendant le défilement du support d'analyse mobile.

Avantageusement, les substances à analyser et les réactifs sont apportés successivement jusqu'aux moyens de réception du support pendant son défilement.

Le procédé peut comprendre en outre une analyse, par des moyens de détection, des substances ayant subi les étapes du protocole.

Les étapes du protocole peuvent comprendre au moins une étape d'apport d'énergie. L'étape d'apport d'énergie peut être une étape d'apport d'énergie thermique.

Selon un mode de mise en œuvre particulier, le procédé se déroule de façon à obtenir successivement :

- l'apport d'un premier composé chimique dans un volume de réaction jusqu'au moyen de réception,

- le déplacement du support d'analyse vers un premier élément d'injection,

- l'apport d'un deuxième composé chimique dans le volume de réaction par le premier élément d'injection,

- et optionnellement, le déplacement du support d'analyse mobile vers un deuxième élément

d'injection pour apporter un troisième composé chimique au volume de réaction.

L'analyse des substances ayant subi les étapes du protocole peut être effectuée directement sur le support d'analyse mobile ou après leur transfert du support d'analyse mobile.

#### **BREVE DESCRIPTION DES DESSINS**

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- les figures 1A et 1B illustrent de façon partielle, un système permettant de réaliser en flux continu un protocole biologique, chimique ou biochimique selon l'invention, la figure 1A montrant un premier support d'analyse mobile en coupe longitudinale tandis que la figure 1B montre le support d'analyse mobile de la figure 1A vu de dessus ;

- la figure 2 est une vue partielle et en coupe longitudinale du support d'analyse mobile lors du fonctionnement du système ;

- la figure 3 montre, en coupe longitudinale et partielle, un deuxième support d'analyse mobile selon l'invention lors du fonctionnement du système ;

- la figure 4 montre, en perspective, un troisième support d'analyse mobile selon l'invention lors du fonctionnement du système ;

- la figure 5 montre, en perspective, un quatrième support d'analyse mobile selon l'invention lors du fonctionnement du système ;

5       - la figure 6 montre, en coupe longitudinale et partiellement, le système selon l'invention où sont visibles trois barreaux thermiques permettant de réaliser des étapes d'un protocole biologique, chimique ou biochimique ;

10       - la figure 7 illustre un cycle PCR réalisé sur un support d'analyse mobile, conformément à l'invention.

#### DESCRIPTION DETAILLÉE DE MODES DE RÉALISATION DE L'INVENTION

15

Comme indiqué ci-dessus, le système peut aussi être avantageusement utilisé pour toute application impliquant un protocole comprenant des étapes en série. Les moyens permettant la mise en œuvre d'un protocole peuvent comprendre par exemple des  
20       moyens d'injection d'un réactif ou d'un échantillon, des moyens de traitement optique (par exemple un traitement ultra-violet) d'un réactif ou d'un échantillon, des moyens de détection par exemple pour  
25       détecter un paramètre d'un constituant d'un échantillon ou de tout marqueur détectable et des moyens de traitement thermique d'un échantillon.

Toute synthèse requérant l'injection en série de réactifs peut en particulier être  
30       avantageusement mis en œuvre selon le procédé et grâce au système de l'invention. A titre d'exemples, les

applications de l'invention comprennent la synthèse de produits chimiques, en particulier de produits chimiques fins, c'est-à-dire ceux fabriqués en petits volumes et/ou avec une très haute qualité. En outre, un  
5 substrat microfluidique ou un dispositif selon l'invention, mettant en œuvre plus d'un protocole, peut être conçu, par exemple pour la synthèse de produits chimiques fins en combinaison avec un dépistage en ligne (par exemple le dépistage de drogues).

10 Dans une application de l'invention, un ou plusieurs réactifs sont disposés sur la surface du support comme il est requis, sous forme d'une gouttelette liquide. D'autres réactifs peuvent être ajoutés par des éléments d'injection positionnés le  
15 long du dispositif, ces éléments d'injection injectant la quantité requise de réactifs. Les caractéristiques du dispositif, comportant entre autres le matériau du support d'analyse, sont choisies de façon à être compatibles avec les caractéristiques des réactions  
20 envisagées, par exemple les températures des réactions et les solvants (par exemple : eau, solvants organiques) mis en œuvre dans la synthèse. Dans un autre mode de réalisation, le système selon l'invention peut être utilisé pour un dépistage de drogue dans  
25 lequel une protéine ou une composition de cellule est fournie au support sous forme d'une gouttelette, un composé de test est injecté par un élément d'injection positionné le long du système et, optionnellement, une étape de détection ou d'analyse est menée sur  
30 l'échantillon, de préférence par des moyens de détection situés sur le système. Dans un autre mode de

réalisation, le système peut être utilisé pour un protocole de détection dans lequel un échantillon est fourni au support d'analyse sous forme de gouttelettes et un élément pour mener une étape de détection est positionné dans le système. Par exemple, la néphélométrie par laser peut être utilisée pour détecter des complexes antigène-anticorps pour le dépistage à débit élevé pour déterminer la solubilité dans l'eau d'une drogue. On peut se reporter à ce sujet à l'article de C.D. BEVAN et al., paru dans Anal. Chem., 15 avril 2000, 72(8), pages 1781 à 1787. Dans d'autres applications, les moyens permettant la mise en œuvre du protocole sont des moyens pour réaliser des traitements ultra-violets. Par exemple, la lumière ultra-violette est connue pour induire une réticulation entre des brins complémentaires d'ADN et entre ADN et protéines. Un échantillon est fourni au support d'analyse sous forme de gouttelette et un élément de traitement aux ultra-violets disposé dans le système est utilisé pour traiter l'échantillon, comme pour une modification de gène ciblée sur la triple hélice (voir l'article de F.X. BARRE et al., paru dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 28 mars 2000, 97(7), pages 3084 à 3088), pour la réticulation de protéines à l'ADN de noyaux de cellules humaines (voir l'article de S. LEJNINE, paru dans Nucleic Acids Res. 15 septembre 1999, 27(18), pages 3676 à 3684), pour l'inactivation d'éléments pathogènes (voir l'article de M. GHALI et al., paru dans J. Neurovirol, octobre 1998, 4(5), pages 521 à 530). Dans d'autres applications de l'invention, des moyens de mise en œuvre d'un protocole comprennent



une zone dans laquelle s'exerce un champ magnétique, comme pour la séparation de constituants d'un échantillon par association avec des perles magnétiques (par exemple la purification par calibrage pour des applications de séquençage utilisant des particules paramagnétiques, G. FRY et al., Biotechniques, juillet 1992, 13(1), pages 124 à 131). Dans d'autres applications de l'invention, les moyens de mise en œuvre d'un protocole comprennent des moyens d'extraction aptes à extraire un volume déterminé d'échantillon ou d'une fraction d'échantillon. Dans d'autres applications, les moyens de mise en œuvre d'un protocole comprennent des éléments thermiques pour porter un échantillon à une température déterminée, par exemple pour réaliser une réaction PCR comme cela va être décrit par la suite.

Les figures 1A et 1B montrent un premier support d'analyse mobile 10 disposé dans le système selon l'invention. Le support 10 est micro-usiné dans un substrat 11 en silicium, en plastique ou en verre. L'usinage permet de réaliser une matrice (par exemple n lignes par m colonnes) de micro-réacteurs 12. Le support d'analyse est lié à un mécanisme de mise en mouvement, dans la direction de la flèche, afin de permettre le défilement de chaque colonne de micro-réacteurs (voir la figure 1B) en regard des différents éléments nécessaires à la réalisation du protocole.

La figure 1A montre que les micro-réacteurs 12 sont constitués à partir de trous (ou puits) traversant le support 11. Un film plastique 13, de faible épaisseur, collé sur la face inférieure du

substrat 11 permet d'obturer le fond des puits. L'intérêt de cette structure est d'assurer un bon échange thermique entre les volumes de réaction au fond des puits et des éléments de contrôle de la température tels que ceux référencés 14 et 15 sur les figures 1A et 1B. En effet, certains protocoles comme la PCR demandent un cyclage en température, typiquement une vingtaine de cycles à 94°C (dénaturation) - 55°C (hybridation) - 72°C (élongation) avec des temps de palier de quelques dizaines de secondes. Ces variations de température sont imposées par des éléments de contrôle de la température tels que ceux référencés 14 et 15 sur les figures 1A et 1B, encore appelés barreaux thermiques et fonctionnant par exemple par effet Peltier ou par circulation d'un fluide caloporteur.

La référence 18 désigne, de manière schématique, un élément permettant d'effectuer la détection du produit obtenu à l'issue du protocole.

Le fluide caloporteur peut circuler à travers un canal circulaire traversant les barreaux thermiques, ou à travers un système d'ailettes permettant d'optimiser les échanges de chaleur entre le fluide caloporteur et le barreau. Chacun des barreaux thermiques est relié à un bain thermostaté avec un système de pompage pour faire circuler le fluide caloporteur.

Il est possible d'intégrer des éléments de mesure de la température dans les barreaux pour asservir la température du bain thermostaté. Il est aussi possible d'intégrer des éléments chauffant complémentaires dans les barreaux thermostatés.

L'élément chauffant est par exemple une résistance électrique travaillant comme une source chaude et le fluide caloporteur comme une source froide. Le chauffage peut être aussi obtenu par rayonnement  
5 lumineux.

Pour augmenter les échanges thermiques, il peut être avantageux d'ajouter un système pour presser le support d'analyse sur le barreau chauffant. Ceci est obtenu par exemple, par un système d'aspiration au  
10 niveau du barreau chauffant ou par un système de bride, le support d'analyse étant pris en sandwich entre la bride et le barreau chauffant.

Pour éviter l'évaporation des substances à analyser et des réactifs, il est particulièrement  
15 avantageux que les puits soient, avant utilisation, remplis d'un liquide non miscible avec les produits qui y seront introduits. Ces différents produits peuvent être amenés par de petits capillaires 16 disposés de manière à introduire successivement les produits à  
20 injecter lorsque le support d'analyse est en défilement. Les capillaires sont par exemple des fibres en silice fondue couramment utilisées dans les dispositifs micro-fluidiques. Le contrôle de la formation d'une goutte en sortie de fibre est par  
25 exemple assuré par un générateur de pression ou par un pousse-seringue.

La figure 2 montre que les puits 12 formés dans le substrat 11 présentent un col 17 favorisant le décrochage des gouttes lorsque les capillaires 16 se  
30 trouvent plongés dans les puits 12. La figure 2 montre la réalisation de deux dépôts. A gauche de la figure,

un capillaire, mis en mouvement horizontal synchronisé avec le support mobile vient déposer une substance à analyser dans un puits déterminé. A droite de la figure, un autre capillaire vient, de manière  
5 identique, ajouter un réactif à une substance déposée dans un puits.

Les gouttes injectées tombent au fond des puits par gravité, le liquide non miscible contenu au fond des puits (typiquement de l'huile) étant plus  
10 léger que les substances à analyser et les réactifs. Ainsi, les capillaires ne sont jamais directement en contact avec les volumes de réaction déjà contenus dans les puits, ce qui permet de s'affranchir des problèmes de contamination. Il est préférable que les surfaces  
15 présentées par le support d'analyse soient très hydrophobes.

Le liquide non miscible avec les substances à analyser et les réactifs peut être de l'huile (minérale, silicone...) ou un solvant organique non  
20 miscible à l'eau tel que l'octane.

Pour éviter l'évaporation, il est aussi possible de recouvrir les puits d'un film de liquide non miscible, les gouttes de substance ou de réactif étant alors injectées dans les puits à une vitesse  
25 déterminée pour traverser le film de liquide non miscible.

La figure 3 illustre un exemple de support d'analyse mobile où les micro-réacteurs sont constitués par des cuvettes. Cette figure montre un support  
30 dont la face supérieure comporte des cuvettes 21. Un film d'huile 22 est prévu sur la face supérieure du

support pour éviter l'évaporation des substances à analyser 23 et des réactifs 24 injectés dans les cuvettes par les distributeurs respectifs 25 et 26.

Dans le mode de réalisation représenté à la figure 4, le support d'analyse mobile est un film 30 ou un tapis roulant. Les substances à analyser et les produits de réaction correspondent à des gouttes déposées sur le film 30 en défilement. Sur la figure 4, on reconnaît des capillaires d'injections 36 et des éléments de contrôle de la température 34 et 35 logés dans une platine 31.

L'accrochage des gouttes est assuré par les forces de capillarité existant entre les gouttes et le film 30. Un système de mise en translation du film permet de véhiculer les gouttes le long des différents éléments permettant le déroulement du protocole (dépôts, chauffages, détection). Dans l'exemple représenté à la figure 4, le film 30 est mis en mouvement par un système de bobinage de manière analogue à une cassette de magnétoscope, le film circulant d'un rouleau dérouleur 37 à un rouleau enrouleur 38.

Le film 30 se déroulant est recouvert d'un film d'huile 32 ou d'un liquide non miscible avec les substances à analyser et les réactifs, afin d'éviter leur évaporation.

L'exemple de réalisation illustré par la figure 4 peut bien sûr comporter plusieurs séries de zones chauffantes pour assurer les cycles désirés, par exemple un cycle PCR.

Le film peut être soit uniforme, soit structuré. Dans le cas d'un film uniforme, il est avantageux que ce film soit légèrement hydrophile afin que la goutte déposée ne roule pas pour assurer  
5 l'accrochage de la goutte sur le film. Il est possible d'utiliser un film en matériau organique (un plastique ou un polyimide tel que le Kapton®) ou un fil métallique (par exemple en aluminium ou en or).

L'intérêt d'un film structuré est de  
10 pouvoir agir sur un auto-positionnement des gouttes. Ceci est par exemple réalisé par un film hydrophobe possédant des plots hydrophiles. Les gouttes se positionnent alors par capillarité sur les plots hydrophiles. Il est aussi possible d'obtenir le même  
15 résultat en structurant le film avec des cuvettes.

Pour optimiser les échanges thermiques et minimiser les flux thermiques entre les éléments de contrôle de la température, il est possible d'utiliser des films ayant une conductivité thermique anisotrope,  
20 c'est-à-dire isolant thermique dans le plan du film et conducteur thermique suivant son épaisseur.

La partie consommable du système se réduit alors à un film qui a l'avantage d'être plus simple et moins coûteux à réaliser que des structures à puits ou  
25 à canaux.

D'autre part, la visibilité des gouttes permet le contrôle en temps réel et la mesure des volumes réactionnels après chaque injection, ce qui peut être avantageux pour la mise au point d'un suivi  
30 de production en temps réel.

Dans le mode de réalisation représenté à la figure 5, le support d'analyse est constitué de fils porteurs de gouttes. Un fil porteur de gouttes peut être de très petite section (de quelques  $\mu\text{m}$  à quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ ). Il est préférable d'utiliser un fil hydrophile pour favoriser l'accrochage des gouttes.

Les volumes de réaction correspondent aux gouttes accrochées aux fils 40. L'accrochage est assuré par des forces de capillarité existant entre les gouttes et les fils. Un système de mise en translation des fils 40 permet de véhiculer les gouttes le long des différents éléments de mise en œuvre du protocole. Le système de mise en translation peut être effectué par un système de bobinage comprenant un rouleau dérouleur 47 et un rouleau enrouleur 48. Pour éviter l'évaporation, il est avantageux que le système baigne dans un fluide non miscible avec les réactifs, par exemple dans l'huile. Les gouttes à accrocher sur les fils 40 peuvent être amenées par un dispositif distributeur ou par des capillaires 46 comme pour le système décrit précédemment.

Sur la figure 5 sont représentés, de manière symbolique, des éléments de contrôle de la température 44, 45. Le contrôle de la température peut être assuré de différentes manières possibles. A titre d'exemple, les gouttes accrochées aux fils 40 peuvent être véhiculées à travers un flux de liquide dont on contrôle la température, ce liquide étant le milieu ambiant, l'huile notamment. Les gouttes peuvent aussi être déplacées à proximité d'éléments de contrôle de la température, de préférence sans qu'il y ait contact.

Les gouttes peuvent encore passer à travers des trous préalablement réalisés dans les zones de contrôle thermique, l'essentiel étant que les gouttes restent toujours accrochées aux fils.

5                    Si les fils 40 sont des fils conducteurs de l'électricité, le passage d'un courant électrique dans ces fils provoque leur échauffement par effet Joule, ce qui permet de chauffer les gouttes. Lorsqu'un refroidissement des gouttes est requis, celui-ci peut  
10 être assuré par le milieu ambiant.

La figure 6 met en évidence des éléments de contrôle de la température. Un bâti 51 supporte une platine 52 sur laquelle défile un support d'analyse mobile 50. Des volumes de réaction 53, sous la forme de  
15 gouttes, sont disposés régulièrement sur le support d'analyse 50. La figure 6 montre trois éléments de contrôle de la température 54, 55 et 56. Ces éléments sont des barreaux thermiques logés dans un matériau isolant 57, leur face supérieure affleurant du matériau  
20 isolant. D'autres moyens de chauffage peuvent être utilisés, par exemple ceux basés sur l'effet Joule, l'effet Peltier, l'effet d'un rayonnement lumineux. Les barreaux thermiques 54, 55 et 56 possèdent un trou de passage d'un fluide caloporteur, tel le trou 58. Leur  
25 face supérieure présente une cavité d'aspiration, telle la cavité 59 sur le barreau thermique 54, reliée à un dispositif d'aspiration afin de plaquer le support d'analyse 50 sur les barreaux thermiques. Le barreau thermique 55 montre une résistance électrique 61  
30 permettant d'accroître la température de ce barreau. Le



barreau thermique 56 montre un élément 62 de mesure de la température de la face supérieure de ce barreau.

La figure 7 représente, de manière schématique, un support d'analyse mobile 70 soumis à un  
5 protocole PCR de 20 cycles. Chaque cycle comprend la soumission d'une substance aux trois températures successives 94°C, 55°C et 72°C fournies par vingt groupes de barreaux thermiques 74, 75 et 76.

L'intérêt de l'invention par rapport aux  
10 techniques de l'état de l'art peut être démontré à partir d'un protocole pour l'analyse d'une série d'échantillons comportant les étapes suivantes :

- mélange d'un premier réactif à un échantillon,
- 15 - cyclage thermique d'une durée  $t_1$ ,
- ajout d'un deuxième réactif,
- cyclage thermique d'une durée  $t_2$ ,
- ajout d'un troisième réactif,
- détection d'une substance, d'une couleur  
20 ou d'une autre grandeur physico-chimique.

L'invention permet de réaliser ce protocole pour un grand nombre d'échantillons (par exemple 384) combiné avec un grand nombre de réactifs différents (par exemple 100). L'invention permet d'obtenir ces  
25 100 x 384 analyses en un temps plus court que les machines utilisant des plaques à puits traditionnelles tout en ayant un mode de réalisation plus simple que les systèmes "lab on a chip". En effet, avec les machines standard travaillant avec des plaques à 384  
30 puits, le temps de mise en œuvre du protocole est de  $100 \times (t_1 + t_2)$ . Ce temps, qui est incompressible, est

en général trop long. On peut noter aussi qu'il est nécessaire de concevoir des robots de manipulation des 100 plaques à puits et un système de gestion et de distribution de  $100 \times 384$  échantillons et de  
5  $3 \times 100 \times 384$  distributions de réactifs.

Avec une machine utilisant des puces à micro-canaux travaillant en flux continu de réactions, il est possible de dimensionner le système pour minimiser le temps nécessaire pour les  $100 \times 384$   
10 réactions grâce au principe du flux continu. Par exemple, il suffit de réaliser une puce à 384 canaux et de faire circuler les uns à la suite des autres, dans chacun des 384 canaux, les 100 réactions sur les différentes zones où sont effectuées les étapes du  
15 protocole. chaque réaction étant séparée l'une de l'autre par des bouchons séparateurs miscibles ou non miscibles (voir le document WO-00/21 666). Le temps nécessaire pour les  $100 \times 384$  réactions est donné par le temps de passage entre deux réactions successives.  
20 Ainsi, une très grande vitesse des liquides permettra de faire circuler toutes les réactions en un minimum de temps.

La vitesse de déplacement des liquides  $V$  se dimensionne par la relation  $V = L/t$  où  $L$  est la  
25 longueur des zones où sont effectués les protocoles biologiques et  $t$  est le temps des protocoles biologiques. Il est donc possible, en prenant des grandes longueurs, d'augmenter la vitesse de déplacement des réactions et donc de minimiser le temps  
30 nécessaire pour obtenir les  $100 \times 384$  réactions. Ce constat pose cependant un problème car la nécessité

d'augmenter la longueur des canaux est contraire à la miniaturisation de la puce micro-fluidique et remet en cause l'utilisation des microtechnologies pour la réalisation du composant. D'autre part, le contrôle des déplacements sur 384 voies en parallèles avec 100 réactions différentes pose un gros problème de conception et, en particulier, il faut maîtriser parfaitement les problématiques de la mécanique des fluides dans des petits canaux.

10 L'invention permet de garder l'avantage du flux continu de réactions concernant la rapidité d'exécution des  $100 \times 384$  réactions sans avoir l'inconvénient du contrôle du déplacement des liquides dans des micro-canaux. En effet, l'invention permet de  
15 réaliser des réactions biologiques en flux continu, en déplaçant le support mobile sur lequel sont immobilisés les volumes de réaction. Le déplacement des volumes de réaction est donc directement contrôlé par le déplacement du support mobile, bien plus simple à  
20 réaliser qu'un système de pompage dans des micro-canaux. Il faut noter aussi, comme autre avantage par rapport aux dispositifs à microcanaux, que la vitesse de déplacement du support d'analyse, et par conséquent des échantillons analysés, est indépendante des volumes  
25 des échantillons ou des volumes injectés.

**REVENDEICATIONS**

1. Système permettant de réaliser en flux continu un protocole biologique, chimique ou biochimique sur des substances à analyser, le protocole  
5 comportant la mise en œuvre de plusieurs étapes, le système étant caractérisé en ce qu'il comprend :

- un support d'analyse mobile (10, 20, 30, 40, 50) comprenant des moyens de réception des substances à analyser et de réactifs,
- 10 - des moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole, disposés de façon que les moyens de réception du support défilent devant eux lors de la mise en œuvre de ces étapes.

2. Système selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des moyens (16, 25, 26, 36, 46) permettant d'apporter successivement les substances à analyser et les réactifs jusqu'aux moyens de réception du support  
20 d'analyse mobile.

3. Système selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des moyens de détection (18) appliqués aux substances ayant  
25 subi les étapes du protocole pour fournir une analyse de ces substances.

4. Système selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les moyens de réception (11) sont disposés de façon à constituer  
30 une matrice de lignes et de colonnes.

5. Système selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le support d'analyse mobile est pourvu de moyens permettant d'éviter l'évaporation des substances à analyser et des réactifs.

6. Système selon la revendication 5, caractérisé en ce que les moyens permettant d'éviter l'évaporation des substances à analyser et des réactifs sont choisis parmi :

- une atmosphère à humidité contrôlée,
- un milieu liquide non miscible avec les substances à analyser, les réactifs et les produits de réaction entre substances à analyser et réactifs,
- un film de liquide non miscible avec les substances à analyser et les réactifs, recouvrant les moyens de réception et apte à être traversé par les substances à analyser et les réactifs.

7. Système selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole comprennent des moyens d'apport d'énergie.

8. Système selon la revendication 7, caractérisé en ce que les moyens d'apport d'énergie sont des moyens de chauffage (14, 15, 34, 35, 44, 45, 54, 55, 56) permettant de porter les moyens de réception à une température déterminée.

9. Système selon la revendication 8, caractérisé en ce que lesdits moyens de chauffage comprennent au moins un barreau thermique (54, 55, 56) porté à ladite température déterminée.

5

10. Système selon la revendication 9, caractérisé en ce que le barreau thermique est porté à ladite température déterminée par la circulation d'un fluide caloporteur et/ou par effet Joule et/ou par effet Peltier et/ou par un rayonnement lumineux.

10

11. Système selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des moyens (59) pour rapprocher le support d'analyse mobile du barreau thermique.

15

12. Système selon la revendication 2, caractérisé en ce que les moyens permettant d'apporter les substances à analyser et les réactifs, et les moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole sont agencés de façon à obtenir successivement :

20

- l'apport d'un premier composé chimique dans un volume de réaction jusqu'au moyen de réception,
- 25 - le déplacement du support d'analyse mobile vers un premier élément d'injection,
- l'apport d'un deuxième composé chimique dans le volume de réaction par le premier élément d'injection,
- 30 - et optionnellement, le déplacement du support d'analyse mobile vers un deuxième élément

d'injection pour apporter un troisième composé chimique au volume de réaction.

13. Système selon la revendication 3,  
5 caractérisé en ce que les moyens de détection (18) sont des moyens fournissant une analyse des substances directement sur le support d'analyse mobile (10).

14. Système selon la revendication 3,  
10 caractérisé en ce que les moyens de détection sont des moyens fournissant une analyse des substances après leur transfert du support d'analyse mobile.

15. Système selon la revendication 1,  
15 caractérisé en ce que le support d'analyse mobile (10) est constitué par une plaque (11), les moyens de réception étant constitués par des puits (12) réalisés dans la plaque.

16. Système selon les revendications 2 et  
20 15 prises ensemble, caractérisé en ce que les moyens permettant d'apporter les substances à analyser et les réactifs comprenant des capillaires (16) s'introduisant dans les puits (12), les puits présentent un col (17)  
25 favorisant le décrochage des substances à analyser et des réactifs desdits capillaires.

17. Système selon la revendication 15,  
caractérisé en ce que la plaque (11) est en un matériau  
30 choisi parmi le silicium, le verre et le plastique.

18. Système selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, caractérisé en ce que les moyens de réception sont constitués de trous (12) traversant la plaque (11), le fond des trous étant  
5 obturé par un film (13) adhérent à une face de la plaque.

19. Système selon la revendication 15, caractérisé en ce que les moyens de réception sont  
10 constitués par des cuvettes (21) réalisées à partir d'une face de la plaque (20).

20. Système selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support d'analyse mobile est  
15 constitué par une plaque, les moyens de réception étant constitués par des plots disposés sur une face de la plaque et permettant l'accrochage des substances à analyser.

20 21. Système selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support d'analyse mobile est un film (30).

22. Système selon la revendication 21,  
25 caractérisé en ce que les moyens de réception résultent de forces de capillarité entre une surface du film et les substances à analyser.

23. Système selon la revendication 21,  
30 caractérisé en ce que le film (30) est mobile entre un rouleau dérouleur (37) et un rouleau enrouleur (38).



24. Système selon la revendication 21,  
caractérisé en ce que le film (30) étant un film  
uniforme, ladite surface du film est une surface  
5 hydrophile.

25. Système selon la revendication 21,  
caractérisé en ce que le film est un film structuré, la  
structuration du film permettant de déterminer  
10 l'emplacement des moyens de réception.

26. Système selon la revendication 25,  
caractérisé en ce que ladite surface du film est  
hydrophobe et supporte des plots hydrophiles  
15 constituant lesdits moyens de réception.

27. Système selon la revendication 25,  
caractérisé en ce que ladite surface du film présente  
des cuvettes constituant lesdits moyens de réception.  
20

28. Système selon la revendication 21,  
caractérisé en ce que le film possède une conductivité  
thermique anisotrope, la conductivité thermique selon  
l'épaisseur du film étant supérieure à la conductivité  
25 thermique dans le plan du film.

29. Système selon la revendication 1,  
caractérisé en ce que le support d'analyse mobile  
comprend au moins un fil (40) permettant l'accrochage  
30 de gouttes des substances à analyser, les moyens de

réception résultant de forces de capillarité entre le fil et les substances à analyser.

30. Système selon la revendication 29,  
5 caractérisé en ce que ledit fil (40) est mobile entre un rouleau dérouleur (47) et un rouleau enrouleur (48).

31. Système selon la revendication 29,  
caractérisé en ce que ledit fil (40) est hydrophile.

10

32. Système selon la revendication 29,  
caractérisé en ce que les moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole comprenant des moyens de chauffage des gouttes accrochées sur le fil, ces moyens  
15 de chauffage comprennent un milieu liquide porté à une température déterminée, non miscible avec les substances à analyser et avec les produits de réaction entre substances à analyser et réactifs, les gouttes passant à travers ce milieu liquide lors du défilement  
20 du support.

33. Système selon la revendication 29,  
caractérisé en ce que les moyens permettant la mise en œuvre des étapes du protocole comprenant des moyens de  
25 chauffage des gouttes accrochées sur le fil, ces moyens de chauffage comprennent un élément pourvu d'un trou de passage dudit fil et porté à une température déterminée.

30 34. Procédé de réalisation, en flux continu, d'un protocole biologique, chimique ou

biochimique sur des substances à analyser, le protocole comportant la mise en œuvre de plusieurs étapes, le procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend :

5 - la mise en défilement d'un support d'analyse mobile (10, 20, 30, 40, 50) comprenant des moyens de réception des substances à analyser et de réactifs,

10 - la mise en œuvre des étapes du protocole sur les substances à analyser pendant le défilement du support d'analyse mobile.

35. Procédé selon la revendication 34, caractérisé en ce que les substances à analyser et les réactifs sont apportés successivement jusqu'aux moyens  
15 de réception du support pendant son défilement.

36. Procédé selon l'une des revendications 34 ou 35, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une analyse, par des moyens de détection, des substances  
20 ayant subi les étapes du protocole.

37. Procédé selon l'une quelconque des revendications 34 à 36, caractérisé en ce que les étapes du protocole comprennent au moins une étape  
25 d'apport d'énergie.

38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce que l'étape d'apport d'énergie est une étape d'apport d'énergie thermique.

30

39. Procédé selon la revendication 35, caractérisé en ce qu'il se déroule de façon à obtenir successivement :

5 - l'apport d'un premier composé chimique dans un volume de réaction jusqu'au moyen de réception,

- le déplacement du support d'analyse mobile vers un premier élément d'injection,

10 - l'apport d'un deuxième composé chimique dans le volume de réaction par le premier élément d'injection,

- et optionnellement, le déplacement du support d'analyse mobile vers un deuxième élément d'injection pour apporter un troisième composé chimique au volume de réaction.

15

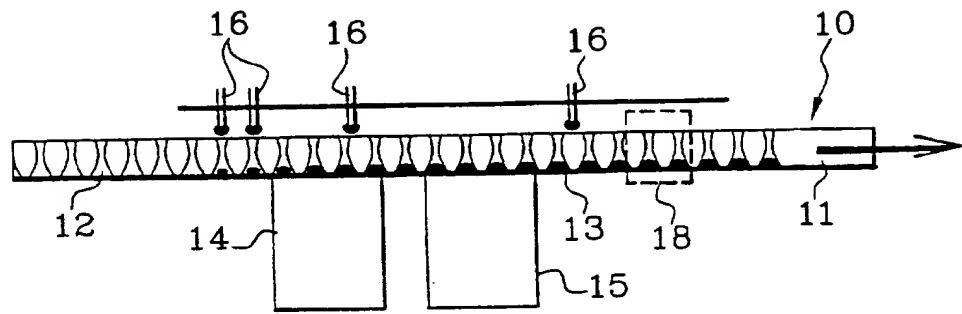
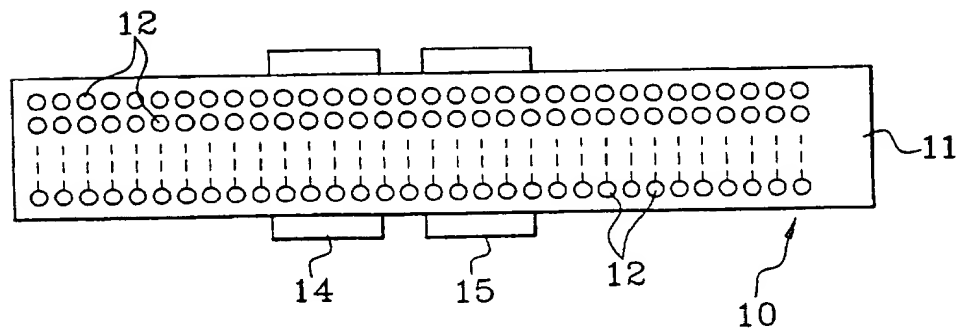
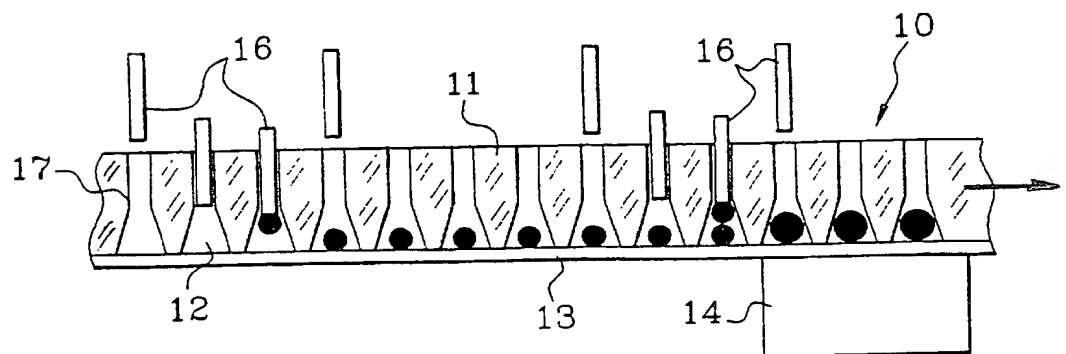
40. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce que ladite analyse des substances ayant subi les étapes du protocole est effectuée directement sur le support d'analyse mobile.

20

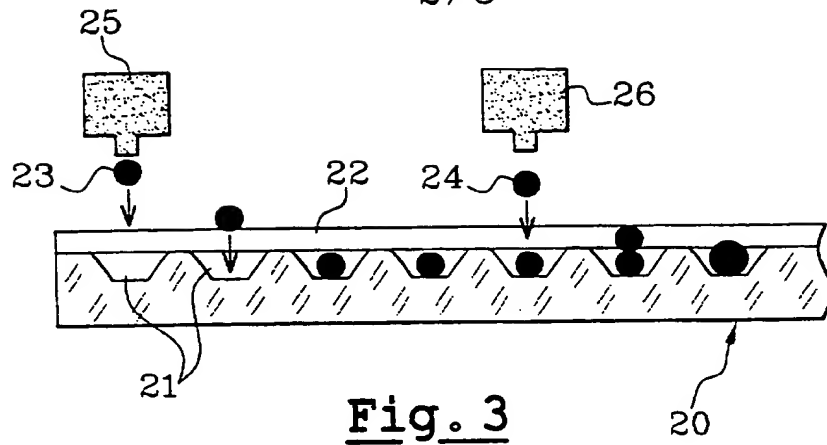
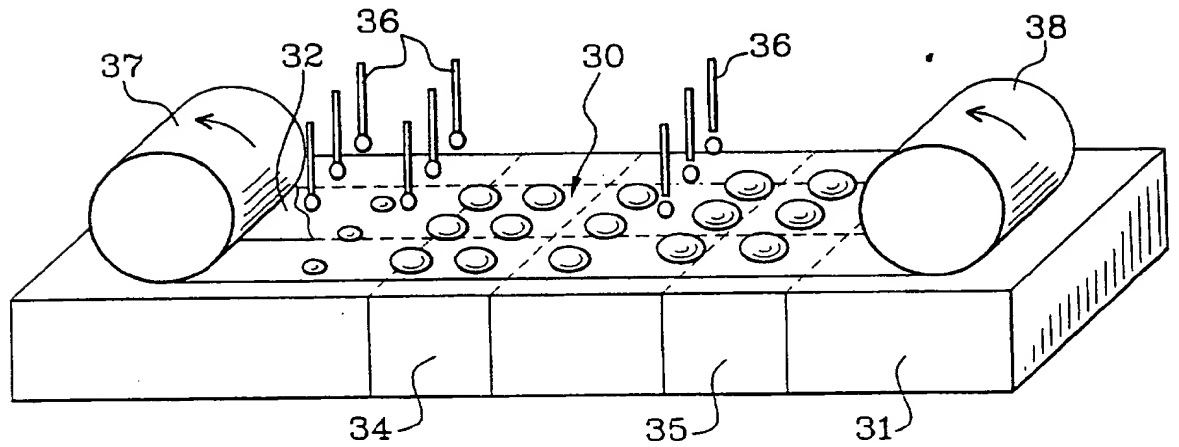
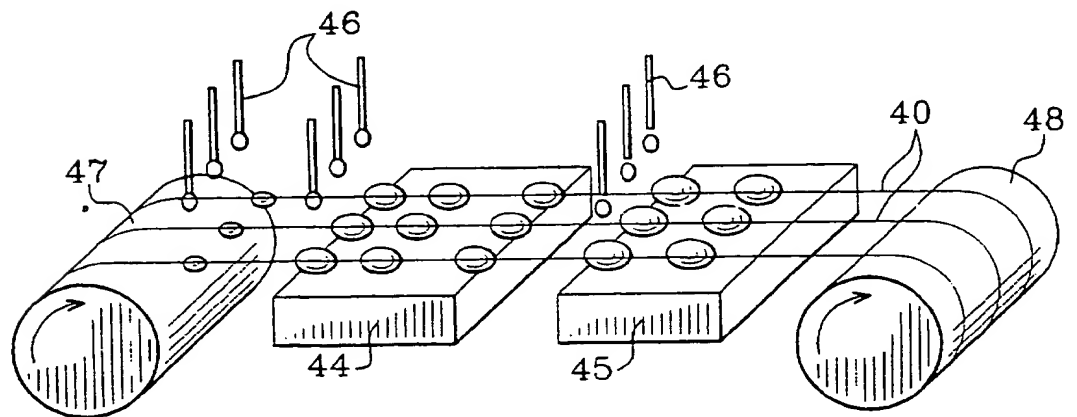
41. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce que ladite analyse des substances ayant subi les étapes du protocole est effectuée après leur transfert du support d'analyse mobile.

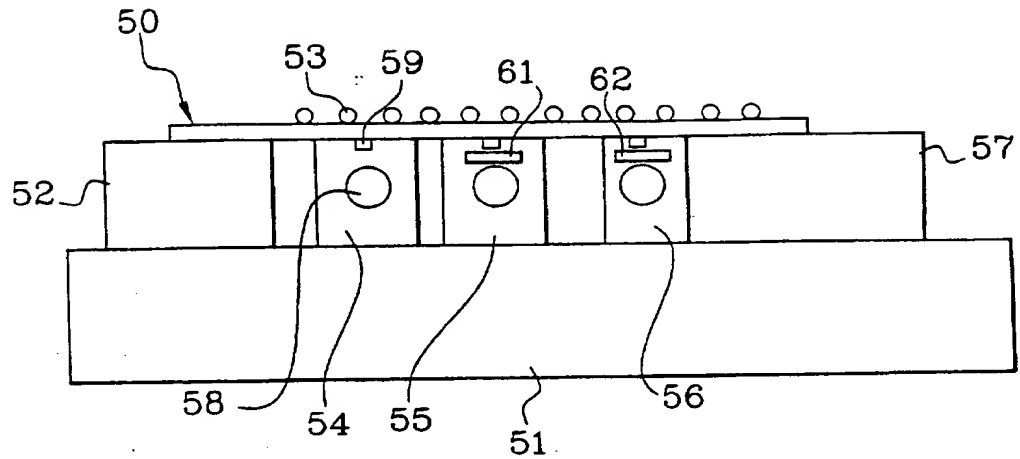
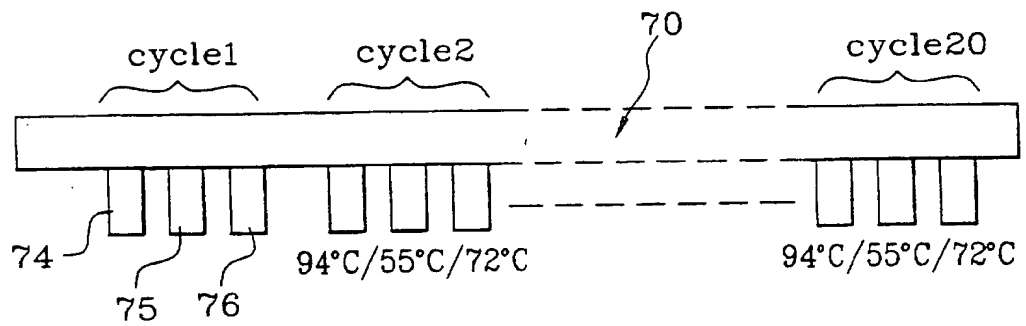
25

1/3

Fig. 1AFig. 1BFig. 2

2/3

Fig. 3Fig. 4Fig. 5

**Fig. 6****Fig. 7**



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

2820058

# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 598923  
FR 0101159

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 99 34920 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 15 juillet 1999 (1999-07-15) * page 1, ligne 30 - page 4, ligne 20; figure 8 *	1-41	B01L3/00 G01N35/00 G01N1/44
X	WO 99 11373 A (HUNTER IAN W) 11 mars 1999 (1999-03-11) * page 1, ligne 30 - page 3, ligne 22; figures *	1-41	
X	US 5 508 200 A (THAYER PHILLIP ET AL) 16 avril 1996 (1996-04-16) * colonne 3, ligne 19 - colonne 5, ligne 38; figures 1-3 *	1-41	
X	US 4 883 642 A (BISCONTE JEAN-CLAUDE) 28 novembre 1989 (1989-11-28) * colonne 4, ligne 29 - colonne 5, ligne 42; figures *	1-41	
X	US 3 566 677 A (COLE BENJAMIN T ET AL) 2 mars 1971 (1971-03-02) * colonne 2, ligne 61 - colonne 3, ligne 40; figures *	1-41	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.Cl.7) G01N
X	WO 95 34374 A (BEHRINGWERKE AG) 21 décembre 1995 (1995-12-21) * page 3, ligne 25 - page 5, ligne 32; figures *	1-41	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
5 novembre 2001		Hocquet, A	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	



**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0101159 FA 598923**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date **05-11-2001**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9934920	A	15-07-1999	AU 2102699 A	26-07-1999
			EP 1051259 A1	15-11-2000
			WO 9934920 A1	15-07-1999
WO 9911373	A	11-03-1999	EP 1007212 A2	14-06-2000
			WO 9911373 A2	11-03-1999
US 5508200	A	16-04-1996	AUCUN	
US 4883642	A	28-11-1989	FR 2565350 A1	06-12-1985
			CA 1272669 A1	14-08-1990
			DE 3569483 D1	24-05-1989
			EP 0186676 A1	09-07-1986
			WO 8505563 A1	19-12-1985
			JP 61502382 T	23-10-1986
US 3566677	A	02-03-1971	AUCUN	
WO 9534374	A	21-12-1995	AT 195266 T	15-08-2000
			CA 2192936 A1	21-12-1995
			DE 69518321 D1	14-09-2000
			DE 69518321 T2	25-01-2001
			DK 764046 T3	18-12-2000
			EP 0764046 A1	26-03-1997
			EP 0983788 A2	08-03-2000
			ES 2150569 T3	01-12-2000
			GR 3034715 T3	31-01-2001
			JP 9510656 T	28-10-1997
			PT 764046 T	29-12-2000
			WO 9534374 A2	21-12-1995
			US 6284546 B1	04-09-2001

